



PCT/PTO 14 OCT 2004

特 許 協 力 条 約



10/510237

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 06 FEB 2004

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 DC0043	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/04761	国際出願日 (日.月.年) 15.04.2003	優先日 (日.月.年) 15.04.2002
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/02		
出願人 (氏名又は名称) 山添 康		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 2 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.08.2003	国際予備審査報告を作成した日 22.01.2004	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  鈴木 美葉子	4 N 9839
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-13 ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 2-8 項、 21.11.2003 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-10 ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 文献1: 山添康, 上原記念生命科学財団研究報告集(2001), Vol. 15, p. 108-109  
 文献2: K. NAGATA, et. al., Xenobio. Metabol. and Dispos. (2001), Vol. 16, No. 5, p. 485-490  
 文献3: Furukawa M, et. al., J Biochem (Tokyo) (2002 Jan), Vol. 131, No. 1, p. 71-78  
 文献4: Goodwin B, et. al., Mol Pharmacol. (1999), Vol. 56, No. 6, p. 1329-1339  
 文献5(追加): Takeshita A, et. al., Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription., Eur J Endocrinol. (2001), Vol. 145, No. 4, p. 513-517  
 文献6(追加): Savas U, et. al., Rabbit pregnane X receptor is activated by rifampicin., Drug Metab Dispos. (2000) Vol. 28, No. 5, p. 529-537

## 【請求の範囲1-8について】

請求の範囲1-8に係る発明は、文献1~6より進歩性を有さない。

文献1には、ヒトCYP3A4遺伝子もラット遺伝子と同様にプロモーター領域が転写制御に関わり、この領域にPXRの結合しうる部位(ER-6)が存在し、転写開始点より約7 kbp上流にPXRを介した転写活性化に関わっている領域(dNR-1)が存在すること、ER-6ならびにdNR-1を組み込んだレポーター遺伝子ベクターを作成し、肝ガン由来培養細胞であるHepG2細胞に導入してレポーターアッセイを行うことにより、CYP3A4の代表的な誘導剤であるリファンピシを用い、誘導剤の有無による転写活性化の違いも調べたこと、HepG2細胞にPXRを過剰発現させたところdNR-1を介した強い転写活性化が認められ、リファンピシンに対する応答も著しく増大したと記載されている。

文献2には、CYP3Aのプロモーター領域(-180nt)のB siteはPXRを結合するAGTTCAが3つの塩基を挟んでdirect repeat(DR-3)が存在しており、また、C siteにはAGTTATとAGGTCAが6つの塩基を挟むeverted repeat(ER-6)で存在する旨、CYP3A4遺伝子のプロモーター領域の転写開始点より上流-362ntまでが含まれるアデノウイルスベクター(AdCYP3A4-362)を細胞に感染させて薬物によるCYP3A4遺伝子の転写活性化の検討を行った旨、CYP3A4遺伝子のプロモーター領域(-362bp)の5'上流にCYP3A4遺伝子の誘導に関わるCYP3A4遺伝子の上流域約7.2kbpから7.8kbp(約600bp、dNR-1を含む)を結合させたレポーターベクター(pCYP3A4-362+7K)を構築し、培養細胞を用いて誘導剤による転写活性化を検討したところ、pCYP3A4-362では僅かしか認められなかった活性化がリファンピシン、クロチマゾールで非常に強く認められた旨、記載されている。

文献3には、CYP3A4遺伝子のプロモーター領域の転写開始点付近(+11nt)より上流-362ntまで(ER6を含む)と、リファンピシンが含まれるアデノウイルスベクター(AdCYP3A4-362)を細胞に感染させて薬物によるCYP3A4遺伝子の転写活性化の検討を行った旨、ER-6とdNR1領域をともに含むアデノウイルスベクターをマウス肝臓に化学物質とともに導入した場合に更に高い遺伝子の活性化を得るだろうと記載されている。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V. 欄の続き

文献4には、CYP3A4遺伝子の上流域-13000～+53にルフェーゼを結合したベクターを用いてCYP3A4の発現量を測定する旨、CYP3A4遺伝子の上流域-13000～+53にhPERの結合モチーフを有する旨、記載されている。

文献5には、PXRを発現するプラスミドとDR3とルフェーゼからなるレポーターコンストラクトをCV-1細胞にともに形質転換する旨、記載されている。

文献6には、SXR/PXR発現プラスミドとCYP3A4のプロモーター領域でXREsを含むレポータープラスミドをHepG2細胞に形質転換し、アッセイする旨、記載されている。

文献1～4には、PXR遺伝子結合領域であるCYP3A遺伝子の上流域とレポーター遺伝子を組み込んだレポーターベクターを用いてCYP3A遺伝子の発現活性を測定することが記載されており、文献2、4には、7.6～7.4k(MIE)を含む領域もPXR遺伝子結合領域として含むこと、文献5、6より、PXRを発現するプラスミドとCYP3Aのプロモーター領域とレポーター遺伝子を含むプラスミドを細胞に共に形質転換することにより転写を検出する旨も公知であることから、形質転換細胞自体が産生するPXRに加えて、更に細胞内のPXRを増すためにCYP3A遺伝子の上流域を含むレポーターベクターと別に、PXRを組み込んだベクターも導入すること、また、CYP3A遺伝子の上流域として、文献1～4に記載される領域を含むことは、容易に想到しうるものであると認められる。



## 請求の範囲

1. 被検薬物を投与された非ヒト動物又は被検薬物含有培地で培養されたヒト培養細胞に、(A) アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるウイルス、及び(B) アデノウイルスベクターにヒトPXR遺伝子を組み込んでなるウイルスを導入し、当該非ヒト動物又はヒト培養細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定することを特徴とする、被検薬物投与時のヒトCYP3A誘導能の測定法。

2 (補正後) . ヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上が、少なくとも7.7k(dNR-1)領域、362(ER-6)領域及び7.6~7.4k(MIE)領域を含むものである請求項1記載の測定法。

3 (補正後) . (a) プラスミドベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるDNAを導入してなる形質転換ヒト培養細胞を、被検薬物含有培地で培養し、レポーター遺伝子の発現量を測定することを特徴とする、被検薬物投与時のヒトCYP3A誘導能の測定法。

4 (補正後) . ヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上が、少なくとも7.7k(dNR-1)領域、362(ER-6)領域及び7.6~7.4k(MIE)領域を含むものである請求項3記載の測定法。

5 (追加) . (A) アデノウイルスベクターに、検出可能なレポーター遺伝子と、ヒトCYP3A遺伝子の非翻訳領域中のヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上を組み込んでなるウイルス、及び(B) アデノウイルスベクターにヒトPXR遺伝子を組み込んでなるウイルスを含有することを特徴とするヒトCYP3A誘導能測定試薬。

6 (追加) . ヒトPXRに結合する領域の少なくとも3ヶ所以上が、少なくとも

